

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LE VIBRION SEPTIQUE

ET LE « BACTERIUM CHAUVÆI »

par M. NICOLLE, E. CÉSARI et M^{lle} A. RAPHAEL

Nous avons été amenés, par des considérations d'ordre général, à entreprendre une série d'expériences sur le vibrion septique et le *bacterium Chauvæi*. Les premiers résultats obtenus nous ont conduits vers de nouvelles recherches très étendues et ainsi s'est développé progressivement le travail que l'on va lire.

Voici la liste des *échantillons utilisés dans nos études*.

V. septique.

(1). Échantillon isolé par nous du sang de vache putréfié, conformément à la tradition classique.

(2). Échantillon isolé par nous d'un cadavre de lapin altéré.

(3), (4). Échantillons isolés par nous de cadavres de cobayes altérés.

B. Chauvæi.

(1). Échantillon isolé par notre ami Jouan (tumeur porcine).

(2), (3). Échantillons Piettre (isolés par nous; tumeurs bovines).

(4), (5). Échantillons Vallée (Calvados et Hautes-Pyrénées), dus à l'obligeance de notre savant collègue.

(6). Échantillon Richart (isolé par nous; tumeur bovine).

(7). Vaccin Leclainche et Vallée (origine Vallée).

Ces germes ont étéensemencés en bouillon-Martin et conservés à la glacière (tubes très nombreux, afin d'espacer le

plus possible les repiquages, dont on connaît l'influence néfaste sur l'activité des bactéries). Pour les expériences, on utilisait des cultures-filles : bouillon-Martin, simple ou faiblement glucosé (0,2 p. 100), selon les circonstances.

Comme *animaux réactifs*, nous avons employé des *cobayes* (mâles, sauf dans certains cas spéciaux) de 500-600 grammes et des *lapins* de 2.000-2.500 grammes.

Nous envisagerons, tour à tour, les points suivants : *effets de la toxine soluble* — *caractères des hémotoxines* — *effets des germes vivants* — *immunité active* — *immunité passive* — *anti-hémotoxicité*.

EFFETS DE LA TOXINE SOLUBLE

Il s'agit de cultures en bouillon-Martin glucosé (0,2 p. 100), filtrées après 5-15 jours d'étuve. Les filtrats sont légèrement acides (tournesol) : leur efficacité ne change pas par neutralisation.

Aucune différence n'est apparue entre le poison des v. septiques et celui des b. Chauvœi. On prendra, comme types, les toxines les plus actives de chaque groupe, que nous avons injectées aux *cobayes* et aux *lapins*, dans les veines et sous la peau.

EXPÉRIENCES SUR LES COBAYES.

Injectons intraveineuses.

2 cent. cubes tuent en 5-10 minutes ; 1 cent. cube, en 1/2 à 2 heures généralement ; 1/2 cent. cube, en 6-12 heures. 10^{-1} cent. cube demeure inoffensif.

On observe les *mêmes formes anatomo-cliniques* que pour la toxine staphylococcique (ces Annales, mars 1914).

Injectons sous-cutanées.

4 cent. cubes tuent la moitié des animaux (en 1-3 jours) ; 2 cent. cubes et même 1 cent. cube produisent une eschare humide ; 10^{-1} cent. cube engendre une eschare du type V ; 10^{-2} cent. cube, un léger œdème transitoire.

Mêmes lésions tégumentaires qu'avec le poison des staphylocoques. A l'autopsie des cas mortels : œdème hémorragique local (sous l'eschare), *sans bulles* gazeuses; épanchement rosé intra-abdominal; congestion plus ou moins marquée des intestins : foie feuille morte (taches nécrotiques, *sans bulles*), reins décolorés (taches nécrotiques); poumons exsangues.

EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS.

Injectons intraveineuses.

Mêmes chiffres que pour les cobayes, mort en un temps variable (quelques minutes — 12 heures). *Les animaux succombent à l'arrêt respiratoire.*

Injectons sous-cutanées.

Grandes différences individuelles. 4 cent. cubes d'un filtrat donné peuvent : tuer; déterminer l'eschare humide; produire seulement le type V; n'engendrer (cas exceptionnel) que l'œdème pur et simple. Derrière ces irrégularités, on discerne cependant nettement une résistance au poison plus grande que celle des cobayes.

Mêmes lésions tégumentaires qu'avec la toxine staphylococcique. A l'autopsie des cas mortels, mêmes altérations que chez les cobayes.

Le chauffage à 55 degrés (1/2 heure) diminue l'activité du poison. Ce fléchissement, assez peu appréciable lors des injections sous-cutanées, devient évident lors des injections intraveineuses (il faut forcer les doses pour tuer).

Le chauffage à 100 degrés (5 minutes) altère notablement la toxine. 4 cent. cubes demeurent inoffensifs par la voie vasculaire; par la voie hypodermique, ils ne produisent que le type V chez le cobaye et l'œdème fugace chez le lapin.

Notre collègue Jouan a constaté, jadis, que des cultures en bouillon-Martin glucosé, additionné d'1/5 de sérum de cheval, conservaient intégralement leur activité toxique après plus de trois mois d'étuve.

Le meilleur poison, obtenu par nous, n'offre point la puissance de celui que décrivent Grassberger et Schattenfroh, comme « solution normale ». Il convient de noter, toutefois, que nous avons filtré et pas seulement « clarifié » les cultures (le procédé Grassberger et Schattenfroh semble bien scabreux) et que nous nous servons d'animaux plus âgés que les leurs. Nous ne saurions admettre les deux affirmations suivantes des auteurs viennois : identité de la dose mortelle, sous la peau et dans les veines ; constance d'une incubation, de 60 minutes environ, lors des injections intraveineuses. Par contre, nous avons constaté avec eux (et Eisenberg) le fléchissement du poison à des températures relativement peu élevées.

CARACTÈRES DES HÉMOTOXINES

Les germes dont nous nous occupons peuvent sécréter des hémotoxines — *lysines* et *agglutinines* — offrant habituellement leur maximum d'activité chez les filtrats des cultures de 5 jours, en bouillon-Martin glucosé. Ces « poisons partiels » sont détruits, aux environs de 55 degrés, après une demi-heure de chauffage.

Nous avons pris comme réactifs les *globules* rouges, lavés, de cinq espèces animales : cobaye, lapin, mouton, cheval, bœuf (émulsions en eau physiologique ; titre : 5 p. 100). On traitait 1 cent. cube de suspension cellulaire par des quantités variables de filtrat : 1/2 cent. cube... 10⁻² cent. cube. L'hémolyse se recherchait à 38 degrés, l'agglutination à 0 degré.

HÉMOLYSINES.

Fait dominant, les filtrats de nos divers échantillons, obtenus dans des conditions identiques et étudiés parallèlement, le même jour, sur la même série de globules, ont montré des *différences qualitatives considérables*. Le tableau ci-joint, où l'on s'est volontairement borné à mentionner le caractère, soit positif soit négatif de l'épreuve, sans aucune donnée numérique, révèle avec clarté ces différences.

Eisenberg avait classé, comme il suit, par sensibilité décroissante, les cinq espèces d'hématies en question : cobaye, lapin, cheval, bœuf, mouton. Une telle classification postule que les lysines ne varient que quantitativement, affirmation insoutenable désormais.

Il y a plus. Les résultats que nous mentionnons permettent de supposer que bien des hémolysines et même bien des

toxines « générales » pourraient offrir des différences qualitatives, selon la race qui les fournit, au sein d'espèces bactériennes parfaitement légitimes.

Inutile d'insister sur l'impossibilité de distinguer les *v. septiques* et les *b. Chauvoei*, d'après les caractères de leurs hémolysines.

ÉCHANTILLONS	HÉMATIES de cobaye.	HÉMATIES de lapin.	HÉMATIES de mouton.	HÉMATIES de cheval.	HÉMATIES de bœuf.
Vibron septique sang	+	+	+	0	0
— lapin	+	+	+	+	+
— cobaye n° 1.	+	+	0	+	+
— cobaye n° 2.	+	0	0	+	+
<i>B. Chauvoei</i> Jouan	+	+	+	+	0
— Piettre n° 1.	+	+	+	+	+
— Piettre n° 2.	+	0	0	0	0
— Vallée-Calvados.	+	+	0	0	0
— Vallée-Hautes-Pyrénées. .	0	+	+	0	+
— Richart	+	+	+	+	0
— Vallée (vaccin)	+	+	+	0	+

Quelques détails, maintenant. Tous les échantillons (sauf le *Chauvoei* Hautes-Pyrénées) dissolvent les *hématies de cobaye* (le plus souvent à 10^{-2} cent. cube, ailleurs à 10^{-1} ou au $1/2$ cent. cube; l'hémolyse est rarement incomplète). — La plupart dissolvent les *hématies de lapin*, mais seulement au $1/2$ cent. cube et d'ordinaire incomplètement. — La majorité dissolvent les *hématies de mouton*, mais au $1/2$ cent. cube et incomplètement une fois sur deux — Les *hématies de cheval et de bœuf* sont dissoutes, par 6 échantillons, au $1/2$ cent. cube (le plus souvent de façon incomplète pour les hématies de cheval, toujours complètement pour les hématies de bœuf).

A noter, seulement, deux types concordants : (1) +++++, réalisé par le septique lapin et le *Chauvoei* Piettre n° 1; (2) +++++ 0, réalisé par les *Chauvoei* Jouan et Richart.

HÉMOAGGLUTININES.

Les globules de cobaye et de lapin se montrent seuls agglutinables. Les premiers, avec tous les échantillons (y compris

le *Chauvæi* Hautes-Pyrénées); les seconds, avec le septique lapin et les *Chauvæi* Jouan, Piettre (1 et 2) et Calvados.

L'agglutination est réalisée, d'ordinaire, à 10^{-2} cent. cube; ailleurs, on l'observe, généralement totale, à 10^{-1} ou au $1/2$ cent. cube.

EFFETS DES GERMES VIVANTS

On prendra comme types les échantillons les plus pathogènes (*v. septiques ou b. Chauvæi, indiscernables ici encore*); quelques lignes seront consacrées, en terminant, aux spécimens moins actifs.

Nous avons injecté des cultures de vingt-quatre heures (37°) en bouillon Martin glucosé, tantôt telles quelles, tantôt lavées à l'eau physiologique par centrifugation (afin d'éliminer la toxine libre). On ramenait les cultures lavées au volume initial, pour assurer la comparabilité des expériences.

Les *cobayes* et *lapins* ont été inoculés *dans les veines, sous la peau et dans les muscles*.

EXPÉRIENCES SUR LES COBAYES.

Injections intraveineuses.

Cultures totales. — Au-dessus de 10^{-1} cent. cube, mêmes effets qu'avec les filtrats (mort encore plus rapide, pour les doses qui ne tuent pas très vite). Avec 10^{-1} cent. cube, les sujets succombent en 12-36 heures (ou résistent, exceptionnellement); avec 10^{-2} cent. cube, on n'observe aucun trouble appréciable (même si l'on ajoute 10^{-1} cent. cube de toxine).

Cultures lavées. — 1 cent. cube tue en 12 heures, 10^{-1} cent. cube demeure inoffensif.

Les germes sont détruits bien plus facilement qu'e sous la peau (*vide infra*), ainsi que l'ont déjà noté les auteurs.

Symptômes et lésions. — Nous distinguerons 2 cas.

Mort en 12 heures. — Aucune différence clinique avec les animaux qui ont reçu les filtrats. *Post mortem*, altérations plus marquées : congestion violente des viscères abdominaux; reins noirs, rate noire, intestins hémorragiques.

Mort en 1 jour-1 jour 1/2. — *Cliniquement.* Rien de spécial, d'habitude, pendant 12-24 heures. Puis : poil piqué ; ventre gros, tendu, sensible ; coma progressif ; mort par arrêt respiratoire. *A l'autopsie :* souvent œdème hémorragique (*avec bulles gazeuses*), partant de la plaie cervicale et s'étendant plus ou moins loin ; congestion variable des intestins ; foie feuille morte (taches nécrotiques, *avec bulles*) ; reins décolorés (taches nécrotiques) ; poumons exsangues.

Injections sous-cutanées.

Aucune différence, ici, entre les cultures totales et les cultures lavées. 1 cent. cube tue en 12 heures (ou moins) ; 10^{-1} à 10^{-2} cent. cube, en 12-36 heures ; 10^{-3} cent. cube, en 24-36 heures (dans la moitié des cas) ; 10^{-4} à 10^{-5} cent. cube, rarement (en 36 heures).

Tous les animaux qui résistent et auxquels on injecte localement, après 3-7 jours, 1-2 cent. cubes de toxine ou 1 goutte d'acide lactique, périssent en 12-36 heures. — *Tous les animaux* qui reçoivent, d'emblée, 10^{-3} cent. cube de culture + 1 cent. cube de toxine, meurent dans la nuit (avec 10^{-6} cent. cube et 1 cent. cube de toxine, résultats négatifs).

Symptômes et lésions. — Nous considérons encore 2 types.

Mort en 12 heures. — *Cliniquement.* Eschare humide, envahissant rapidement l'abdomen et reposant sur un œdème plat et crépitant. Après quelques heures : immobilité, stupeur ; ventre gros, sensible et tendu. Puis, coma et mort par arrêt respiratoire. *A l'autopsie :* œdème hémorragique (*avec bulles*) sous l'eschare ; épanchement rosé intra-abdominal ; congestion plus ou moins hémorragique des intestins ; foie feuille morte (taches nécrotiques, *avec bulles*) ; reins décolorés (taches nécrotiques) ; poumons exsangues. L'odeur butyrique, mentionnée dans les livres, ne nous a jamais beaucoup frappés ; par contre, nous avons plusieurs fois rencontré la *rupture de l'estomac*, dont personne ne parle.

Mort en 1 jour-1 jour 1/2. — *Cliniquement.* Après 12 heures, lésions locales variables (empatement minime, type V, eschare humide), d'habitude type V demeurant sec jusqu'à la mort. Les symptômes généraux éclatent souvent d'une façon tardive et suivent une marche très rapide, comme chez les animaux charbonneux (il est curieux de voir certains sujets, d'apparence normale et porteurs de lésions minimes, succomber ainsi, « pendant que l'on a le dos tourné »). *Post mortem*, altérations classiques.

[Inutile d'ajouter que le sang du cœur donne *toujours* des cultures positives, quel que soit le temps de survie.]

Injectons intramusculaires.

La destruction des germes s'opère plus rapidement que sous la peau, comme le montre ce qui va suivre (*aucune différence, ici encore, entre les cultures totales et les cultures lavées*).

1 cent. cube et 10^{-1} cent. cube tuent en 12-24 heures; 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} cent. cube amènent rarement la mort; 10^{-3} cent. cube, jamais.

Les injections révélatrices ne sont qu'exceptionnellement efficaces chez les sujets qui ont reçu 10^{-4} - 10^{-5} cent. cube de culture. Par contre, tous les animaux auxquels on administre, d'emblée, 10^{-5} cent. cube de culture + 1 cent. cube de toxine périssent en un jour.

Symptômes et lésions. — Mêmes phénomènes généraux et mêmes altérations *post mortem* que lors d'inoculation hypodermique. *Localement* : empatement marqué, qui gagne plus ou moins les parties voisines (quand la mort n'est pas trop rapide, eschare tégumentaire pâle, luisante et cerclée de brun) — violente hypérémie des muscles, avec œdème rouge envahissant (bulles gazeuses).

Dans un cas, chez une femelle pleine, nous avons noté de la congestion hémorragique de l'utérus et du placenta; les *fœtus* (2 cent. environ) ont donné des *cultures positives*.

EXPÉRIENCES SUR LES LAPINS.

Injectons intraveineuses.

Cultures totales. — Mêmes effets qu'avec les filtrats.

Cultures lavées. — 2 centimètres cubes tuent dans la nuit; 1 cent. cube, le plus souvent en 2 jours (réaction abdominale moindre que chez le cobaye).

Injectons sous-cutanées.

Cultures lavées. — 2 centimètres cubes déterminent un empatement transitoire (érythème inconstant des téguments).

Cultures totales. — 2 cent. cubes (ou 1 cent. cube + II gouttes

d'acide lactique) engendrent l'eschare humide, sans phénomènes généraux; 10^{-1} cent. cube, l'œdème fugace (érythème ou non).

[Les *animaux nouveau-nés* ne jouissent pas de l'état réfractaire; ils meurent en un jour, quand on leur injecte $1/2$ cent. cube de culture totale.]

Injectons intramusculaires.

Contrairement à ce que nous avons noté chez le cobaye, elles sont ici *plus sévères que les injections sous-cutanées*. 1 cent. cube (parfois 10^{-1} cent. cube) de culture totale tue en 12-24 heures les sujets adultes et, *a fortiori*, les nouveau-nés (*tumeurs charbonneuses* types, noires au centre, saumonées alentour).

Fait curieux : chez plusieurs lapins, qui avaient supporté impunément 10^{-1} , 10^{-2} ou 10^{-3} cent. cube de culture totale, l'acide lactique, *loco læso*, n'a pas réveillé les germes après quelques jours, alors que, chez un animal qui avait reçu, sans réagir, 10^{-3} cent. cube, l'injection intraveineuse d'une solution faible de bicarbonate de soude (40 cent. cubes) fut bientôt suivie d'infection type.

Tels sont les résultats obtenus avec nos échantillons les plus pathogènes. Pour montrer la gamme d'activité décroissante des autres, rien ne vaut quelques chiffres, concernant l'injection sous-cutanée chez le cobaye.

Spécimens moyennement pathogènes. — 1 cent. cube tue en 12-24 heures; 10^{-1} cent. cube, en 12-36 heures (dans la moitié des cas); 10^{-2} cent. cube, jamais.

Spécimens faiblement pathogènes. — 1 cent. cube ne tue qu'en 1 jour $1/2$ -2 jours $1/2$ — ou même : 2 cent. cubes tuent en 4-6 jours $1/2$ habituellement, mais ne déterminent parfois qu'une escharification des téguments (énorme, il est vrai).

Spécimen quasi-inactif (vaccin Vallée). — 3 cent. cubes occasionnent une simple nécrose locale, d'étendue souvent modérée.

Ajoutons que la toxicité des filtrats marche toujours de pair avec la faculté pathogène.

Tout ce que nous avons observé confirme donc l'opinion classique, c'est-à-dire la subordination de ce pouvoir infectant au pouvoir toxigène.

On s'explique ainsi : l'innocuité de 10^{-4} cent. cube de culture lavée dans les veines du cobaye (alors que 10^{-1} cent. cube de culture totale amène la

mort); l'innocuité de 2 cent. cubes de culture lavée sous la peau du lapin (alors que 2 cent. cubes de culture totale engendre une eschare humide); la nocuité constante de 10-5 cent. cube de culture + 1 cent. cube de toxine, sous la peau ou dans les muscles de cobaye; etc.....

Les microbes dont il est question ici ne se multiplient (infection d'emblée — réveil) que dans les tissus naturellement nécrosés par leur poison, artificiellement nécrosés par divers moyens (acide lactique, entre autres). Chez le cobaye, le muscle résiste mieux à la mortification que les téguments; chez le lapin, c'est l'inverse; d'où les apparences « croisées », que révèle l'expérimentation.

La disparition des germes sera d'autant plus rapide, selon nous, que cette nécrose préalable (soit locale, soit viscérale) s'opérera plus difficilement; d'où les gammes (vitesse décroissante de destruction): veine, muscle, hypoderme, chez le cobaye — hypoderme, veine, muscle, chez le lapin.

IMMUNITÉ ACTIVE

Si le pouvoir infectant est uniquement fonction du pouvoir toxigène, l'immunité antitoxique doit entraîner, *ipso facto*, l'impossibilité du développement des germes chez l'animal. — Nous allons le montrer sans peine.

Si, jusqu'à présent, nous n'avons pu trouver un seul caractère différenciel entre les v. septiques et les *b. Chauvæi*, il semble bien probable que nous n'en rencontrerons pas davantage sur le terrain de la résistance acquise. — L'expérience va transformer cette probabilité en certitude.

Pour rendre les sujets (*cobayes*) réfractaires au poison, nous leur avons injecté, plusieurs fois, sous la peau, 2 cent. cubes du filtrat de l'échantillon Jouan (*b. Chauvæi*). Chaque nouvelle injection n'était faite qu'après cicatrisation totale de l'ulcus résultant de l'eschare antécédente. Les choses se sont passées sans la moindre difficulté. 3-4 séances (assez souvent 2, rarement 5) ont suffi pour rendre les téguments insensibles à la « toxine-Jouan » et à celle des autres échantillons (v. septiques ou *b. Chauvæi*). Les divers poisons actifs, introduits dans les veines des vaccinés (dose mortelle en quelques minutes), ne déterminaient aucun trouble appréciable, soit immédiat, soit tardif.

Les sujets auxquels nous avons conféré une telle immunité antitoxique résistaient *schématiquement* aux injections sous-cutanées de *v. septiques* et de *b. Chauvoei*, comme le démontre le tableau ci-joint.

[2 cobayes vaccinés et deux témoins recevaient, parallèlement, la quantité de culture (bouillon Martin, 24 heures d'étuve) indiquée sur ce tableau.]

ÉCHANTILLONS	DOSE injectée.	RÉSULTATS OBTENUS CHEZ :	
		les 2 cobayes vaccinés.	les 2 témoins.
Vibron septique sang. . .	10 ⁻¹ c.c.	Réaction nulle.	Mort en 12 heures.
— lapin	10 ⁻¹ c.c.	—	Mort en 12 et 36 heures.
<i>B. Chauvoei</i> Jouan	1/2 c.c.	—	Mort en 8 et 12 heures.
— Piettre n° 1.	1/2 c.c.	—	Mort en 12 heures et 2 jours.
— Vallée-Calvados . . .	1 c.c.	—	Mort en 1 jour 1/2 et 2 jours 1/2.
— Vallée-Htes-Pyrénées.	2 c.c.	—	Mort en 6 jours 1/2 et eschare énorme.
— Richart.	10 ⁻¹ c.c.	—	Mort en 12 et 24 heures.

IMMUNITÉ PASSIVE

Le sérum des cobayes, vaccinés avec la « toxine Jouan », s'est montré capable de neutraliser les poisons des divers échantillons et d'empêcher l'infection par ces mêmes germes.

ACTION ANTITOXIQUE.

Préventivement, 3 cent. cubes de sérum, introduits la veille dans les muscles du cobaye, rendent inoffensives et l'injection sous-cutanée et l'injection intraveineuse (dose qui tue « sur la table »).

Par mélange (1/2 heure de contact — température ordinaire), 1 cent. cube neutralise tous les effets des divers poisons.

[Inutile de dire que le sérum normal de cobaye n'offre aucun pouvoir antitoxique.]

ACTION ANTIINFECTIEUSE.

Absolument *schématique*, ici encore, ainsi qu'en témoigne le tableau que l'on va lire.

[1 cent. cube était mélangé à 1/2 cent. cube de culture (bouillon Martin, 24 heures d'étuve); à 2 cent. cubes, pour l'échantillon Hautes-Pyrénées. Après une demi-heure de contact (température ordinaire), on injectait le tout sous la peau d'un cobaye. Des témoins, avec sérum normal de cobaye et sans sérum, étaient faits parallèlement.]

ÉCHANTILLONS	DOSE injectée.	RÉSULTATS OBTENUS CHEZ :		
		le cobaye antisérum.	le cobaye sérum normal.	le cobaye témoin.
Vibron septique sang.	1/2 c. c.	Réact. nulle	Mort en 12 h.	Mort en 12 h.
— lapin	—	—	—	—
— cobaye n° 1	—	—	—	—
— cobaye n° 2	—	—	—	—
<i>B. Chauvæi</i> Jouan	—	—	—	—
— Piettre n° 1	—	—	Mort en 36 h.	Mort en 36 h.
— Piettre n° 2	—	—	Mort en 12 h.	Mort en 12 h.
— Vallée-Calvados	—	—	Mort en 48 h.	Mort en 60 h.
— Vallée-H.-Pyrénées.	2 c. c.	—	—	Mort en 24 h.
— Richart.	1/2 c. c.	—	Mort en 12 h.	Mort en 12 h.

Nous avons traité quelques cobayes par les cultures totales de vaccin Leclainche et Vallée (4 injections sous-cutanées de 3 cent. cubes). Ces animaux ont parfaitement supporté l'inoculation hypodermique du v. septique lapin. Leur sérum neutralisait sans peine ce v. septique lapin et les *b. Chauvæi* Calvados, Hautes-Pyrénées et Richart. Il nous a paru inutile de multiplier de telles expériences, aussi en sommes-nous restés là.

ANTIHEMOTOXICITÉ

Le sérum des cobayes, vaccinés avec les « filtrats Jouan », neutralise *tous les effets hémotoxiques* des divers échantillons, mentionnés plus haut (1/4 cent. cube de sérum + 1/2 cent.

cube de filtrat). Le sérum normal de cobaye n'a manifesté que rarement une faible activité.

Nos recherches, entreprises, avons-nous dit, pour élucider certaines questions d'ordre général (dont il sera parlé ailleurs), se trouvent confirmer et « illustrer » deux idées nettement formulées jadis par M. le D^r Roux : identité des v. septiques et des *b. Chauvæi* — subordination de leur pouvoir infectant à leur fonction toxigène.

SUR L'ACTION FAVORABLE EXERCÉE PAR LE MANGANÈSE SUR LA FERMENTATION ACÉTIQUE

par GABRIEL BERTRAND et ROBERT SAZERAC.

L'importance physiologique du manganèse apparaît chaque jour plus évidente : non seulement, il est démontré que ce métal fait partie de la composition chimique élémentaire des cellules vivantes, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (1), mais on connaît déjà un des rôles qu'il est susceptible de remplir, celui d'intermédiaire entre l'oxygène libre et la matière organique dans les phénomènes conditionnés par la laccase (2). C'est même en s'appuyant sur ces notions fondamentales que l'emploi du manganèse, premier type des engrais dits *catalytiques*, a pu être introduit dans la pratique agricole : de minimes quantités de sels solubles de manganèse, ajoutées à un sol trop pauvre en cet élément, peuvent augmenter les récoltes dans des proportions parfois considérables (3).

Il n'y a pas que les plantes supérieures à profiter de la présence du manganèse contenu dans le milieu de culture : il en est de même des moisissures, comme l'ont montré, notamment, les recherches publiées par l'un de nous, seul ou en collaboration avec Javillier (4). Kayser, d'autre part, a réussi à modifier avantageusement la proportion d'alcool produite par la levure aux dépens du sucre (5). Nous venons de constater qu'une

(1) GABRIEL BERTRAND et MEDIGRECEANU, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 1013 (1912) et t. XXVII, p. 1 et p. 282 (1913).

(2) GABRIEL BERTRAND, *Bull. de la Soc. chim.*, 3^e série, t. XVII, p. 619 et p. 753 (1897).

(3) GABRIEL BERTRAND, *Sur le rôle des infiniment petits chimiques en Agriculture* (Conférence au VIII^e Congrès de Chimie appliquée, New-York, 1912; reproduite dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, 1912 et dans la *Revue scientifique*, 1913).

(4) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXVI, p. 241, 515 et 767 (1912).

(5) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLIV, 1907, p. 574.

Bactériacée, le *mycoderma aceti* de Pasteur (aujourd'hui *bacterium aceti* Hansen), oxydait beaucoup plus rapidement l'alcool pour le transformer en acide acétique dans un milieu additionné d'une petite quantité de manganèse que dans le même milieu non additionné et naturellement très pauvre en ce métal.

Le milieu qui nous a servi a été préparé en faisant bouillir de la levure haute de brasserie, préalablement débarrassée par un lavage rapide à l'eau glacée des substances solubles qui l'imprégnaient, avec 5 à 10 fois son poids d'eau ordinaire. La décoction, séparée de la levure et à peu près refroidie, a été additionnée d'un peu de blanc d'œuf, acidifiée très légèrement par l'acide acétique, portée de nouveau à l'ébullition pour coaguler l'albumine et filtrée au papier. Suivant les circonstances de sa préparation : durée du lavage, rapport des poids de levure et d'eau, degré d'acidification, etc., le liquide obtenu renferme plus ou moins de matières dissoutes et de manganèse, comme on le verra dans les deux séries d'expériences que nous rapportons ici.

Le milieu nutritif parfaitement limpide a été réparti, par portions de 50 cent. cubes, dans des fioles coniques d'un quart de litre et additionné, suivant les fioles, d'une proportion plus ou moins grande de sulfate de manganèse pur. Les fioles ont ensuite été bouchées avec un tampon d'ouate et un capuchon de papier à filtre, stérilisées 15 minutes à $+ 110$ degrés et refroidies. On a versé dans chacune 2,5 c. c. d'alcool à 95 degrés, puis on aensemencé, aussi régulièrement que possible, avec une culture très active de *mycoderma aceti* et placé dans une chambre thermostat, à la température de $+ 28$ degrés. Enfin, de temps en temps, on a dosé, en opérant chaque fois sur le contenu total d'une fiole, l'acide acétique formé, par titrage à la soude normale, en présence de phtaléine de phénol comme indicateur.

Nous donnons les résultats des deux séries d'expériences les plus caractéristiques que nous avons effectuées.

Première série. — Le milieu nutritif, préparé de façon à contenir 5 grammes d'extrait sec par litre, ne contenait que des traces de manganèse, voisines de 2,5 millièmes de milligramme

pour les 50 cent. cubes, placés dans chaque fiole (1). Nous avons trouvé :

PROPORTIONS de sulfate de Mn ajoutées.	QUANTITÉS D'ACIDE ACÉTIQUE FORMÉES APRÈS :				
	2 jours.	3 jours.	5 jours.	6 jours.	7 jours.
0 (témoins)	0 gr. 210	0 gr. 378	1 gr. 512	1 gr. 986	2 gr. 166
1/1.000.000.	0 gr. 216	0 gr. 306	1 gr. 500	1 gr. 944	2 gr. 100
1/500.000.	0 gr. 222	0 gr. 390	1 gr. 506	1 gr. 998	2 gr. 238
1/100.000.	0 gr. 222	0 gr. 396	1 gr. 704	2 gr. 106	2 gr. 208
1/50.000.	0 gr. 240	0 gr. 420	1 gr. 920	2 gr. 052	2 gr. 232
1/10.000.	0 gr. 312	0 gr. 532	2 gr. 166	2 gr. 322	2 gr. 370
1/5.000.	0 gr. 312	0 gr. 540	2 gr. 004	2 gr. 226	2 gr. 304
1/1.000.	0 gr. 360	0 gr. 438	1 gr. 560	1 gr. 818	1 gr. 872

Deuxième série. — Dans les expériences de cette série, le milieu nutritif, beaucoup plus riche en produits solubles et surtout en manganèse, renfermait 7,5 gr. d'extrait par litre et une proportion de manganèse équivalant à 0,05 milligr. par fiole. En outre, l'action du microbe a été prolongée davantage que dans la première série. Voici les résultats obtenus :

PROPORTIONS de sulfate de Mn ajoutées.	QUANTITÉS D'ACIDE ACÉTIQUE TROUVÉES APRÈS :				
	3 jours.	4 jours.	5 jours.	8 jours.	10 jours.
0 (témoins)	0 gr. 660	1 gr. 266	1 gr. 998	0 gr. 786	0 gr. 546
1/100.000.	1 gr. 170	2 gr. 010	2 gr. 166	1 gr. 092	0 gr. 618
1/10.000.	0 gr. 900	1 gr. 732	2 gr. 232	1 gr. 026	0 gr. 540
1/5.000.	0 gr. 960	1 gr. 806	2 gr. 046	0 gr. 978	0 gr. 684
1/1.000.	1 gr. 080	1 gr. 872	2 gr. 118	1 gr. 230	0 gr. 738
1/500.	0 gr. 330	1 gr. 710	2 gr. 112	1 gr. 392	0 gr. 072
1/250.	0 gr. 132	0 gr. 900	1 gr. 230	0 gr. 810	0 gr. 504

Comme on le voit par ces résultats, qui concordent, d'ailleurs, au moins dans leur allure générale, avec les autres que nous

(1) Le métal a été dosé suivant la méthode décrite dans le *Bull. de la Soc. Chim.*, 4^e série, t. IX (1911), p. 361.

avons obtenus, la vitesse de transformation de l'alcool en acide acétique par la bactérie est fortement accélérée par l'addition d'une certaine proportion de manganèse : l'accélération croît d'abord avec la proportion de métal, passe par un maximum, puis décroît. Avec la race de ferment dont nous nous sommes servis et dans le milieu le plus pauvre, c'est en présence de 1/10.000 environ de sulfate de manganèse cristallisé, c'est-à-dire de 1/40.000 environ de métal, que la vitesse d'oxydation a été la plus grande (1).

Ces résultats portent à supposer que le rôle oxydasique du manganèse, déjà établi chez les plantes supérieures, existe aussi chez les Bactériacées, c'est-à-dire chez un groupe de plantes dont les échanges nutritifs se rapprochent parfois singulièrement de ceux des animaux.

(1) Au moment où nous avons publié un résumé de ce travail (*Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVII, 1913, p. 149) nous avons indiqué que Rothenbach et Hoffmann avaient essayé, sans succès (d'après un extrait donné par eux dans *Centralb. f. Bakt.*, 2^e partie, t. XIX, 1907, p. 586), d'augmenter l'action oxydante de *bacterium ascendens* par addition de sulfate de fer ou de manganèse et nous avons émis la supposition que ces auteurs avaient probablement opéré dans des conditions ne permettant pas d'obtenir les résultats très nets que nous rapportons ici. Nous avons pu nous procurer depuis le travail original (*Die deutsche Essigindustrie*, t. II, 1907, p. 125) et nous avons vérifié que notre supposition était exacte : entre autres conditions désavantageuses, la dose de sulfate de manganèse ajoutée était trop forte.

SUR LE SÉRODIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE

par E. DEBAINS et F. JUPILLE.

(Laboratoires de M. Metchnikoff et de l'Hôpital civil de Versailles.)

Au cours des maladies infectieuses les organismes infectés réagissent par la production de sensibilisatrices spécifiques dont l'existence dans le sang peut être révélée par la réaction de Bordet-Gengou; alors que la présence des agglutinines est variable, celle des sensibilisatrices est constante. En est-il de même dans la tuberculose, si variée dans ses manifestations et son évolution? Les auteurs qui se sont occupés de cette question ont abouti aux résultats les plus contradictoires; en 1909, MM. Bezançon et de Serbonnes, résumant leurs propres recherches et celles de leurs devanciers, s'expriment ainsi : « La réaction de fixation dans la tuberculose pulmonaire ne donne aucun renseignement au point de vue clinique, tant au point de vue du diagnostic que du pronostic...; ainsi donc, malgré sa spécificité, la réaction de fixation dans la tuberculose ne présente, à notre avis, qu'un intérêt clinique nul. »

Tout récemment encore l'opinion dominante était que l'apparition d'une sensibilisatrice dans le sang des tuberculeux est inconstante, passagère, soumise à l'influence de causes banales, par conséquent inutilisable en vue d'un diagnostic. Nous allons voir que cette opinion est erronée; en réalité, à part quelques exceptions que nous signalerons, le sang des malades renferme d'une façon constante un anticorps spécifique dans toutes les formes et à tous les stades de la tuberculose.

Les cultures du bacille de Koch en milieu peptoné-glycériné, les extraits obtenus par traitement des corps bacillaires, ne contiennent pas d'antigène capable de fixer régulièrement l'alexine en présence des sérums tuberculeux.

MM. Calmette et Massol ont réalisé un important progrès dans leur étude sur les sérums inhibants et les antigènes tuberculeux; par macération de corps bacillaires dans l'eau peptonée

ils ont obtenu un extrait qui se comporte comme un antigène très sensible ; en effet, sur 134 sérums d'hommes tuberculeux examinés par la méthode de Bordet-Gengou, il a été obtenu 92,5 p. 100 de réactions positives.

En cultivant le bacille tuberculeux dans le « bouillon à l'œuf », milieu dont il est l'auteur, M. A. Besredka a obtenu une culture abondante, homogène, se développant en profondeur, et dans laquelle s'élabore une tuberculine douée de propriétés remarquables, capable de fixer énergiquement l'alexine en présence des sérums tuberculeux, alors que la fixation est nulle avec le sérum des sujets sains ou atteints d'affections diverses. En comparant entre eux d'autres antigènes préparés par des méthodes variées, nous avons constaté que les uns possédaient une action très inconstante et que d'autres avaient le grave inconvénient d'être antihémolytiques en présence des sérums normaux, alors que, par eux-mêmes, ils ne gênaient nullement le fonctionnement d'un système hémolytique.

L'action des sérums normaux sur les propriétés favorisantes ou empêchantes des antigènes vis-à-vis de l'hémolyse doit être soigneusement étudiée.

L'importance des résultats obtenus par M. Besredka dans ses travaux sur la tuberculine à l'œuf nous a engagés à entreprendre une étude méthodique du sérum de l'homme tuberculeux. Nous nous sommes proposé de rechercher si la réaction de fixation est positive à tous les stades de la tuberculose pulmonaire, si elle existe dans les autres formes de tuberculose : tuberculose osseuse, ganglionnaire, articulaire, pleurale, péritonéale, génitale, urinaire, cutanée, méningée, etc.

Avant d'exposer les résultats obtenus, nous devons indiquer la technique que nous avons adoptée après de nombreux essais.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

Lorsqu'on examine le sang de sujets sains, ou supposés tels, on s'aperçoit que nombre de sérums possèdent un léger pouvoir fixateur vis-à-vis de l'alexine en présence de la tuberculine de Besredka, propriété qui paraît coïncider avec une cutiréaction positive chez un sujet normal, ne présentant cliniquement aucune lésion suspecte, ou aucune altération d'un état général excellent.

Afin d'éviter toute erreur dans l'interprétation des résultats, nous prenons une dose fixe d'antigène et faisons varier la quantité d'alexine ; l'intensité de la réaction s'apprécie en déterminant les doses croissantes d'alexine diluée et titrée que peut fixer le sérum étudié en présence de l'antigène.

Le rôle de l'alexine étant capital, il importe d'en étudier l'activité et de la titrer rigoureusement. L'alexine du cobaye est très variable d'un animal à l'autre et son activité est soumise à diverses influences dont les principales sont : le froid, la digestion, l'état de grossesse... ; elle est très instable pendant les premiers moments qui suivent la saignée. Il est donc nécessaire de se placer toujours dans les mêmes conditions ; on choisira de préférence un cobaye mâle, de poids moyen, à jeun depuis quelques heures ; l'alexine sera utilisée deux heures après la saignée et diluée seulement au moment de l'emploi.

L'activité de l'alexine est mesurée par une expérience préliminaire, en présence de deux sérums normaux, en suivant pour chaque sérum la marche indiquée dans le tableau suivant :

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Sérum normal	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Alexine à 1/30. . . .	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Eau physiologique . .	1,1	1 »	0,9	0,8	0,7	0,6

Laisser une heure à l'étuve et ajouter dans chaque tube : Ambocepteur titré 0,1 c. c., globules de sang lavés à 20 p. 100 0,1 c. c. Remettre à l'étuve une demi-heure ; laisser vingt minutes à la température du laboratoire et faire la lecture (1).

Le plus souvent, l'hémolyse est obtenue avec la dose de 0,3 ou 0,4 ; si l'activité de l'alexine est plus faible, on emploiera une dilution moins forte 1/25, 1/20, 1/15 ; mais il ne faut pas dépasser la concentration de 1/15, car la lecture des résultats manquerait de netteté ; lorsque l'activité du sérum de cobaye est insuffisante, il est préférable de se servir d'une autre alexine.

(1) Le titre de l'ambocepteur doit être tel que 0,1 c. c. hémolyse en 10 minutes 0,1 c. c. d'une émulsion de globules rouges lavés à 20 p. 100, en présence de 0,1 c. c. d'une alexine active diluée au 1/30.

La réaction de fixation s'effectue d'après le mode opératoire suivant :

	1	2	3	4	5
	—	—	—	—	—
Sérum inactivé à 56 degrés .	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigène titré	0 »	0,3	0,3	0,3	0,3
Alexine diluée.	0,5	0,4	0,5	0,6	0,7
Eau physiologique.	0,7	0,5	0,4	0,23	0,2

Laisser une demi-heure à la température du laboratoire, puis une heure à l'étuve.

Ajouter dans tous les tubes 0,1 c. c. d'ambocepteur et 0,1 c. c. de globules lavés à 20 p. 100.

Remettre à l'étuve une demi-heure; laisser les tubes vingt minutes à la température du laboratoire et faire la lecture. Les résultats, dont la lecture est d'une extrême netteté, sont ainsi caractérisés: *positif*, *négatif*, *partiellement positif*. Les sérums sont inactivés par un chauffage de une demi-heure à 56 degrés.

Le tube qui ne contient pas d'antigène est un témoin destiné à montrer que le sérum étudié n'est pas antihémolytique par lui-même (1).

Il est indispensable d'opérer en présence de sérums normaux (deux au moins) qui sont les véritables témoins de la bonne marche de la réaction et de l'activité de l'alexine.

L'antigène possède un pouvoir antihémolytique assez marqué, mais qui disparaît si on l'additionne d'une matière albuminoïde, même en faible quantité; sérum normal ou ovalbumine; l'antigène doit donc être titré en présence d'un sérum normal.

Les sérums à étudier et les sérums témoins doivent être « frais », c'est-à-dire utilisés dans les trois jours qui suivent la saignée; après quatre ou cinq jours les sérums, même normaux et stériles, deviennent antialexiques.

En étudiant un très grand nombre de sérums, nous avons constaté que ceux qui donnent une réaction de Wassermann

(1) On doit obtenir une hémolyse limite dans le tube (2); le léger pouvoir fixateur présenté par certains sérums normaux et que nous avons signalé plus haut se manifeste par un arrêt plus ou moins marqué de l'hémolyse dans le même tube.

très positive fixent l'alexine en présence de la tuberculine de Besredka.

Cette fixation est due aux lipoïdes du jaune d'œuf modifiés par la culture et qui, dans ce cas, se comportent comme un antigène syphilitique. Il y a donc lieu de pratiquer parallèlement les deux réactions: d'ailleurs beaucoup de sérums à réaction de Wassermann positive donnent une réaction négative avec la tuberculine.

On sait que le pouvoir fixateur des sérums syphilitiques est souvent diminué, quelquefois détruit par le chauffage à 56 degrés; ce chauffage est donc avantageux lorsqu'on doit effectuer une réaction de fixation avec la tuberculine; toutefois, les anticorps tuberculeux ne sont pas indifférents à l'action de la chaleur. Dans le cas d'un sérum non syphilitique, donnant une réaction douteuse avec la tuberculine, on pourra utilement répéter la réaction sur ce sérum non chauffé en suivant les indications données par l'un de nous (1).

LA RÉACTION DE FIXATION CHEZ LES TUBERCULEUX ET LES NON TUBERCULEUX.

Nous avons examiné le sang de 610 personnes, dont 580 ont pu être examinées cliniquement. Dans presque tous les cas nous avons effectué simultanément la réaction à la tuberculine et la réaction de Wassermann.

Nous avons étudié la réaction à tous les stades de la tuberculose pulmonaire et dans toutes les autres manifestations de la tuberculose. Nous avons étudié sa constance et son intensité chez un même malade, et nous avons recherché si elle était influencée par les affections intercurrentes les plus variées (fièvre typhoïde, paratyphoïde, grippe, rhumatisme, cirrhose, salpingites, péritonites, néoplasmes, etc.). Nous avons, d'autre part, étudié le sang de sujets sains et de sujets non tuberculeux atteints d'affections les plus diverses, autres que celles déjà citées (maladies éruptives, diphtérie, bronchite fétide, gangrène pulmonaire, anémies, arthrites, ulcères, pneumonie, érythème polymorphe, infection puerpérale, paraplégies, sar-

(1) E. DEBAINS, *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 6 juin 1914.

come fémoral, tumeurs diverses, lymphadénites, échinococcose, dermatoses, etc).

Les sujets examinés se répartissent ainsi :

	NOMBRE des sujets examinés	REACTION positive p. 100
a) <i>Malades cliniquement tuberculeux :</i>		
1 ^o Tuberculeux pulmonaires aux 2 ^e et 3 ^e degrés, avec mauvais état général.	59	81,3
2 ^o Tuberculeux pulmonaires aux 1 ^{er} et 2 ^e degrés, avec état général satisfaisant	95	90,3
3 ^o Tuberculeux au début, ne présentant que des signes discrets ou douteux	61	93,4
4 ^o Tuberculeux aux 1 ^{er} et 2 ^e degrés, atteints d'affections diverses	52	89,4
5 ^o Tuberculose pleurale, avec épanchement	12	9 »
6 ^o Tuberculose pleurale, sans épanchement	15	86,6
7 ^o Méningites tuberculeuses.	18	0
8 ^o Granulie, typhobacillose.	10	0
9 ^o Tuberculosés diverses (sans lésions pulmonaires en activité).	75	96 »
Ces tuberculosés diverses se décomposent ainsi :		
Tuberculose osseuse	24	
— articulaire (coxalgie).	9	
— ganglionnaire	18	
— péritonéale	4	
— testiculaire.	4	
— urinaire (rénale).	7	
— laryngée.	4	
— cutanée (lupus)	5	
Total.	75	
b) <i>Malades cliniquement non tuberculeux</i>	121	17,3
c) <i>Sujets sains.</i>	62	3,2
Total.	580	

Le nombre des réactions de Wassermann positives était de 24 p. 100 chez les malades cliniquement tuberculeux et de 35,5 p. 100 chez les autres malades. Cette forte proportion tient à la fois au rôle considérable joué par la syphilis en pathologie humaine et au fait que, parmi les 121 malades cliniquement non tuberculeux, un grand nombre étaient en pleine évolution de syphilis secondaire et en cours de traitement; ceci explique le nombre élevé de réactions positives constatées chez ces malades; lorsque la réaction de Wassermann est

fortement positive, et l'examen clinique douteux, on ne peut, au point de vue tuberculeux, conclure qu'avec réserve.

Chez les tuberculeux pulmonaires au troisième degré, grands cavitaires, cachectiques, fébricitants, la réaction peut être nulle ou partielle; elle est très souvent négative chez les pleurétiques avec épanchement.

Les granuliques, les méningitiques donnent presque toujours une réaction négative, les anticorps tuberculeux étant probablement neutralisés par les produits de sécrétion du bacille de Koch (1). Parmi les tuberculeux considérés cliniquement comme guéris ou dont les lésions étaient en voie de cicatrisation et l'état général très satisfaisant, il a été fréquent d'observer des réactions partielles, voire négatives.

Pour plusieurs malades, l'analyse du sang et l'examen clinique ont pu être répétés plusieurs fois au cours d'une année (4 et 5 fois pour quelques-uns); nous avons pu ainsi vérifier la constance de la réaction.

Il est à remarquer que les tuberculoses diverses : osseuse, articulaire, ganglionnaire, urinaire, testiculaire péritonéale, laryngée et cutanée, donnent un nombre très élevé de réactions positives.

Dans quelques cas de tuberculose pulmonaire au deuxième degré, nettement caractérisée par l'examen clinique, la réaction a cependant été négative sans qu'on puisse donner de ce fait une explication plausible; ce sont des exceptions qu'on observe dans toutes les réactions biologiques.

Chez nombre de malades considérés comme suspects, les signes cliniques étant le plus souvent nuls ou douteux, nous avons observé une réaction positive.

Certains sujets chez lesquels on ne soupçonnait aucune lésion bacillaire et dont le sang réagissait positivement ont été soigneusement examinés.

Les uns ont présenté des signes très discrets; chez les autres, il a été impossible de constater aucun signe objectif; parmi ces derniers, il a été fréquent de rencontrer des personnes cohabitant ou ayant cohabité longtemps avec des tuberculeux.

Quelques personnes dont l'examen clinique avait été négatif

(1) BESREDKA, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CLVI, p. 1633.

étant mortes d'affections diverses, il a été possible de constater à l'autopsie l'existence de lésions minimales mais très nettes. Un cas intéressant à signaler est celui d'une jeune fille de vingt ans atteinte d'érythème polymorphe dont le sang donnait une réaction positive, alors que l'auscultation pulmonaire était négative et qui, trois semaines plus tard, était frappée d'hémoptysie grave.

CONCLUSIONS.

De l'ensemble des faits que nous venons d'exposer, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

— *La tuberculine de Besredka fixe l'alexine en présence du sérum des tuberculeux dans presque toutes les formes de la tuberculose.*

— *La réaction de fixation, remarquablement constante et sensible, correspond à des lésions en évolution ou ayant présenté antérieurement un certain degré d'activité ; elle n'est pas sensiblement influencée par des affections intercurrentes.*

— *Contrairement à la cutiréaction, elle possède une grande valeur clinique et permet d'affirmer le diagnostic de tuberculose alors que les signes cliniques sont encore muets ou douteux. La tuberculine de Besredka offre donc au clinicien une ressource précieuse pour le diagnostic de la tuberculose au début.*

Chez les tuberculeux gravement atteints et chez les tuberculeux en voie de guérison, la réaction, devenant assez fréquemment partielle ou négative, peut, dans une certaine mesure, être utilisée pour le pronostic.

Janvier 1913 — Juin 1914.

RECHERCHES SUR LA FIXATION DES TOXINES

PAR LES LEUCOCYTES

par KOBZARENKO

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Il y a plus de vingt ans que s'engagea la discussion entre les partisans de la théorie phagocytaire de Metchnikoff et ceux de la théorie des alexines de Büchner, et c'est surtout en ces cinq dernières années que de multiples recherches ont été consacrées à l'étude de cette question.

Finalement, les deux côtés opposés ont admis que les leucocytes sont capables, dans certains cas, de jouer un rôle actif dans la lutte contre les agents pathogènes, tout en restant impuissants dans certains autres.

Le rôle des leucocytes dans les maladies infectieuses est connu depuis les recherches classiques de Metchnikoff [1] et nous savons bien aujourd'hui que, dans beaucoup de processus infectieux (pneumocoque, streptocoque, staphylocoque), l'organisme lutte contre l'agent infectieux au moyen des globules blancs, qui sont envisagés par Metchnikoff, comme les principaux défenseurs de l'organisme non seulement contre les bactéries, mais également contre leurs toxines.

Tandis que Baumgarten [2] s'opposait énergiquement à cette doctrine, Schattenfroh [3] écarta toutes les objections en démontrant le premier que les leucocytes, complètement débarrassés de sérum, contiennent des substances bactéricides. Plus tard, Schneider [4], Much [5] et ses élèves Zeissler, Hossler, Sterk, etc., ont confirmé ce fait et ont considéré ces substances bactéricides des leucocytes comme les principaux agents antibactériens prenant naissance exclusivement dans les leucocytes et non aux dépens des substances humorales.

Petterson [6] et ses élèves Kling, Zindal, Stenström ont fait beaucoup de travaux importants dans cette voie et ont démontré que les leucocytes détruisent non seulement les bactéries telles que le bacille typhique, le bacille cholérique,

le pneumocoque et le streptocoque, mais aussi les bactéries du groupe du bacille tuberculeux et notamment le bacille tuberculeux humain.

D'après l'avis de ces auteurs, le corps des leucocytes vivants et même morts renferme des substances que Petterson a appelées endolysines, possédant la propriété de détruire les bactéries.

Gruber, Futaki [7], Bail [8] et Weil [9] partagent cette façon de voir et attribuent la fonction bactéricide non pas à la cellule vivante, mais aux substances chimiques qu'elle contient.

Mais si parfois ces matières ne sont pas actives après la mort de la cellule, cela tient à la difficulté qu'on éprouve à les extraire du corps de la cellule.

La propriété de ces substances de n'agir que durant la vie du leucocyte est expliquée par Petterson, par la circonstance que les bactéries sont soumi-es dans le corps du leucocyte, grâce au mouvement amiboïde de ce dernier, à l'action directe de l'endolysine.

Metchnikoff, au contraire, attribue la fonction bactéricide à l'action vitale des leucocytes et en particulier à la phagocytose.

Ainsi nous voyons que, malgré le rôle important que jouent les leucocytes vis-à-vis des bactéries, le caractère de cette activité est loin d'être défini. Nous connaissons encore moins le rôle des leucocytes dans la destruction des toxines et la production des anticorps. Metchnikoff est d'avis que les leucocytes absorbent les toxines et présentent la cause de l'immunité naturelle contre ces dernières. Cette façon de voir n'est pas partagée par Ehrlich : d'après sa théorie, le poison bactérien n'est fixé que par les cellules sur lesquelles il exerce son action destructive. Cette dernière théorie est basée principalement sur les recherches de Wassermann et Takaki [10] qui ont trouvé que la substance cérébrale et celle de la moelle épinière neutralisent la toxine tétanique.

Il est douteux qu'il y ait un rapport quelconque entre les antitoxines et la substance qui neutralise dans ces expériences le poison tétanique. Dernièrement, Petterson a démontré que les macrophages du lapin neutralisent aussi, quoique faiblement, le poison tétanique. Pour ce qui est de la neutralisation des toxines par les leucocytes, on se trouve ici également en face

d'une question encore obscure. C'est donc avec plaisir que j'ai accepté la proposition de Metchnikoff d'élucider le rôle des leucocytes dans la destruction des toxines.

Les résultats des recherches consacrées à cette question sont contradictoires et peu nombreux. Metchnikoff a trouvé chez les poules, qui sont, d'après ses expériences, peu sensibles à la toxine tétanique, que celle-ci est fixée par le sang et les glandes génitales; en inoculant plus tard à des poules de la toxine, il constata que le sang en contenait moins que l'exsudat riche en leucocytes. En partant de ces données, Metchnikoff arrive à la conclusion que les leucocytes sont capables d'absorber la toxine tétanique.

Metchnikoff explique l'action relativement faible des leucocytes par le fait que, dans le pus, tous les leucocytes se désagrègent, et que l'antitoxine passe dans le sérum.

Brieger, Kitasato et Wassermann ont trouvé que l'extrait de thymus de veau neutralise la toxine tétanique, mais ces expériences n'ont pu être confirmées par Petterson, qui a trouvé à son tour que seuls les macrophages de lapin peuvent, encore que faiblement, neutraliser le poison tétanique. Mancini [15] qui a travaillé avec les leucocytes de cheval, a trouvé qu'ils étaient incapables de neutraliser le poison tétanique.

Les mêmes résultats ont été obtenus par Stenström [16] qui faisait des expériences avec des leucocytes de cobayes et de rats.

D'après cet auteur, ni les leucocytes de rats, ni ceux de cobayes, ni les macrophages de cobayes ne sont capables de neutraliser la toxine diphtérique.

Wolff [17] conclut, à la suite de ses expériences, que les leucocytes de cobayes sont bien capables d'absorber la toxine tétanique, mais ne peuvent pas la neutraliser. De plus, il arrive à un résultat tout à fait imprévu : d'un mélange de toxine et d'antitoxine tétanique les leucocytes absorbent la première et deviennent toxiques.

Les résultats obtenus presque simultanément dans différents laboratoires par Schymanowsky, Friedberger [18], Massone [19] et Miyaji [20] sont très intéressants. Ces auteurs ont trouvé que non seulement la formation de la toxine anaphylactique est entravée considérablement en présence de leucocytes, mais même le poison déjà formé dans ces conditions perd sa toxicité.

On voit, d'après cette courte revue de la littérature, combien la question est loin d'être résolue.

Dans mes recherches sur la fixation de toxines par les leucocytes je me suis servi des toxines diphtérique et tétanique. Ces toxines ont été mises à ma disposition par le service sérothérapique de l'Institut Pasteur. Je déterminais la dose toxique pour le cobaye que j'ai choisi comme animal d'expérience.

Nos premières expériences ont été faites suivant la méthode de Petterson et Stenström.

L'émulsion de leucocytes provenant d'exsudat était mélangée à de la toxine, et ce mélange inoculé après un séjour d'une heure à l'étuve à 37°5.

Les leucocytes s'obtenaient par la méthode ordinaire.

On inoculait dans le péritoine de l'animal en question un mélange stérilisé de bouillon et d'aleurone à 5 p. 100 et, vingt heures plus tard, le péritoine de l'animal était lavé à la solution physiologique de chlorure de sodium contenant du citrate de soude à 0,5 p. 100.

Les leucocytes étaient séparés par centrifugation et lavés de nouveau avec la solution physiologique. Ils étaient ensuite pesés, mélangés avec la toxine et le mélange mis à l'étuve.

On inoculait aux cobayes soit ce mélange tel que, soit le liquide seul débarrassé des leucocytes par centrifugation.

Voici mes expériences :

TABLEAU I. *Toxine diphtérique + leucocytes de cobaye.* — Inoculation sous-cutanée aux cobayes d'un mélange : leucocytes + toxine. D'autres cobayes ont été inoculés avec la toxine seule comme témoins. La dose toxique était de 0,01 cent. cube; les animaux d'un poids de 200 grammes succombaient dans l'espace de 4 jours.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,4	250 gr.	6 jours.	240 gr.	6 jours.
0,01	0,6	280 gr.	4 jours.	270 gr.	5 jours.
0,015	0,5	215 gr.	3 jours.	220 gr.	3 jours.
0,02	0,5	230 gr.	2 jours.	240 gr.	2 jours.

TABLEAU II. *Même expérience*, mais au lieu d'inoculer le mélange de liquide et de leucocytes, on inocule le *liquide seul*.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,4	235 gr.	6 jours.	240 gr.	6 jours.
0,01	0,6	265 gr.	5 jours.	270 gr.	5 jours.
0,015	0,5	200 gr.	3 jours.	220 gr.	3 jours.
0,02	0,6	230 gr.	2 jours.	240 gr.	2 jours.

Nous avons ainsi obtenu les mêmes résultats que M. Stenström; les leucocytes de l'exsudat de cobayes sont incapables de fixer ou d'absorber la toxine diphtérique *in vitro* après une heure de séjour à l'étuve.

Comme les cobayes sont très sensibles à l'action de la toxine diphtérique et que leurs leucocytes ne sont pas capables de lutter contre ce poison, je me suis décidé d'expérimenter avec les leucocytes de rats. Ne voulant pas répéter les expériences du Stenström, qui a également travaillé avec les leucocytes de rats, je me suis attaché à obtenir les macrophages de ces animaux. Besredka avait vu en effet que les macrophages pouvaient empêcher l'intoxication par le sulfate d'arsenic et Petterson constate une action analogue vis-à-vis de la toxine tétanique.

Pour obtenir ces cellules je me suis servi de la méthode du Kling [21]; on prépare un mélange de blanc d'œuf très finement trituré et de liquide physiologique. On injecte ce mélange à deux reprises, à vingt-quatre heures d'intervalle et on tue l'animal quatre jours après. On obtient ces macrophages par la même méthode qu'on a employé pour obtenir les leucocytes.

Pour obtenir les macrophages chez les rats j'ai injecté à ces animaux la dose de 3 cent. cubes du mélange décrit ci-dessus et j'ai obtenu 60 à 65 p. 100 de macrophages.

TABLEAU III. *Macrophages de rats.*

La marche de l'expérience est la même que celle du tableau I.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de macrophages	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,4	200 gr.	6 jours.	180 gr.	6 jours.
0,01	0,5	210 gr.	4 jours.	200 gr.	5 jours.
0,015	0,5	205 gr.	2 jours.	210 gr.	2 jours.
0,02	0,5	190 gr.	1 jour.	170 gr.	1 jour.

TABLEAU IV. *Macrophages de rats.*

La marche de l'expérience est la même que celle du tableau I.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de macrophages	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,6	185 gr.	5 jours.	180 gr.	6 jours.
0,01	0,5	175 gr.	4 jours.	200 gr.	5 jours.
0,015	0,4	190 gr.	2 jours.	210 gr.	2 jours.
0,02	0,6	200 gr.	2 jours.	170 gr.	1 jour.

Ainsi les macrophages de rats ne sont capables ni d'absorber, ni de neutraliser *in vitro* la toxine diphtérique après un séjour d'une heure à l'étuve.

Il était intéressant de voir agir ces macrophages non *in vitro* mais *in vivo*. Dans ce but, avant d'inoculer la toxine, j'avais provoqué dans le péritoine de rats une leucocytose avec prédominance de macrophages et ensuite j'ai inoculé de la toxine diphtérique. Les animaux ont succombé comme dans les cas précédents. Il est fort possible qu'ici la toxine ait été absorbée avant que l'action des macrophages ait pu s'exercer. En tenant compte de la circonstance que ces leucocytes extraits ne sont plus des cellules normales, il était intéressant de voir comment se comporteraient vis-à-vis la toxine les leucocytes extraits du

sang de l'animal. On pouvait penser en effet que les leucocytes provenant d'exsudats, tout en conservant leur capacité phagocytaire, ont perdu leur faculté d'absorption grâce à la quantité de bouillon qu'ils ont avalé.

Pour obtenir les leucocytes du sang je me suis servi de chevaux de l'abattoir municipal, ayant soin de choisir toujours des chevaux bien portants et n'ayant pas plus de huit ans d'âge. Pour avoir des leucocytes à l'état frais je prenais pour chaque expérience une nouvelle portion de sang.

Pour extraire les leucocytes du sang de chevaux je me suis servi de la méthode Hekta [22] en modifiant un peu sa technique. On ajoute au sang, pour en empêcher la coagulation, une solution de citrate de soude à 1,2 p. 100 et de chlorure de sodium à 0,8 p. 100. On laisse déposer les globules rouges et on sépare les leucocytes surnageants par centrifugation. D'après les expériences de Hekta [22] et Hamburger [23] une solution de citrate de soude à 0,4 p. 100 n'a aucune influence sur l'activité vitale des leucocytes, surtout si ces derniers ont été ensuite lavés avec la solution physiologique. Ordinairement j'ai opéré de la manière suivante : je mettais dans une haute éprouvette 250 cent. cubes d'une solution préparée avec le citrate à 1,2 p. 100. Je stérilisais le tout à l'autoclave. Ensuite, je recueillais dans cette éprouvette le sang veineux d'un cheval à l'aide d'un trocart muni d'un tube en caoutchouc. J'obtenais de cette manière du sang qui contenait 0,3 p. 100 de citrate de soude. Cette quantité suffit amplement pour empêcher la coagulation.

Je laissais déposer le sang dans cette même éprouvette pendant deux heures, temps nécessaire pour que les globules rouges tombent au fond du vase, tandis que les globules blancs restent en suspension dans le liquide trouble. On décante le liquide surnageant dans des tubes, on le centrifuge pendant une demi-minute (centrifugeur électrique). Chaque litre de sang me donnait environ 15 tubes. Après la centrifugation, il se forme au fond de chaque tube un dépôt de globules blancs avec une petite quantité de globules rouges. Pour débarrasser les globules blancs de globules rouges je réunissais le dépôt dans un tube et je le laissai déposer pendant deux heures. Après ce temps, on trouve au fond du tube surtout les globules blancs qui s'agglomèrent facilement, tandis que les globules rouges

avec une petite partie des globules blancs sont restés en suspension dans le liquide.

Les globules blancs ainsi obtenus sont lavés avec de la solution physiologique, pesés à l'état humide et examinés au moyen d'une certaine méthode de coloration, dont je parlerai plus bas, afin de déterminer s'ils ont conservé leur vitalité.

Ordinairement, pour chaque dose de toxine, je prenais 0,4 à 0,5 centimètre cube de leucocytes. Avec les leucocytes ainsi obtenus, qui, dans la plupart des cas étaient des polynucléaires, je mettais les expériences en train dans le même ordre qu'avec les leucocytes provenant des exsudats. J'ajoutais à chaque dose de toxine les leucocytes et je mettais le mélange à l'étuve à 37°5 en tenant compte de la quantité du mélange, qui devait être partout la même. La toxine sans leucocytes qui devait servir comme témoin était également placée à l'étuve pendant une heure.

Ensuite, j'inoculais aux animaux soit le mélange tel quel, soit la partie liquide seule débarrassée de leucocytes par centrifugation.

La première façon de faire permettait de se rendre compte de la neutralisation de la toxine, la seconde de son absorption dans le cas où la neutralisation de la toxine ne se produisait pas.

TABLEAU V. *Toxine diphtérique + leucocytes de cheval.* — Inoculation sous-cutanée aux cobayes du mélange, après séjour d'une heure à l'étuve. La dose mortelle de toxine reste la même. Les animaux témoins sont inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,4	310 gr.	6 jours.	323 gr.	7 jours.
0,01	0,5	290 gr.	5 jours.	300 gr.	5 jours.
0,015	0,5	300 gr.	5 jours.	310 gr.	2 jours.
0,02	0,5	300 gr.	2 jours.	300 gr.	12 heures.

TABLEAU VI. *Toxine diphtérique + leucocytes de cheval*, après un séjour d'une heure à l'étuve. On inocule la partie liquide séparée des leucocytes par centrifugation. Les animaux témoins sont inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,5	315 gr.	6 jours.	320 gr.	7 jours.
0,01	0,5	310 gr.	4 jours.	300 gr.	5 jours.
0,015	0,4	300 gr.	3 jours.	310 gr.	2 jours.
0,02	0,4	230 gr.	2 jours.	300 gr.	12 heures.

Ainsi nous voyons que les leucocytes provenant du sang de cheval de même que les leucocytes provenant de l'exsudat n'ont aucune influence sur la toxine diphtérique après séjour d'une heure à l'étuve. Ils sont incapables ni d'absorber, ni de neutraliser la toxine.

En partant de cette considération que la neutralisation de toxines dans l'organisme en cas de maladie doit se produire très lentement et non dans l'espace d'une heure comme je l'ai fait dans mes expériences, j'ai décidé de prolonger la durée de l'action de leucocytes et comme essai préliminaire j'ai prolongé le contact pendant douze heures. Une autre circonstance justifiant ma thèse était que nos expériences se faisaient non dans l'organisme vivant, mais avec des leucocytes affaiblis par les différentes manipulations auxquelles ils ont été soumis, comme la centrifugation et l'action du citrate de soude. Dans ces conditions on ne peut pas exiger d'eux une action aussi énergique que lorsqu'ils agissent au sein de l'organisme même. L'action des leucocytes *in vitro* doit être plus lente et même, si dans l'organisme la neutralisation de toxines par les leucocytes se produit très vite, on ne doit pas s'attendre à ce qu'ils produisent le même effet en dehors de ce dernier.

On peut évidemment nous objecter que le séjour de douze heures à l'étuve peut être nuisible pour les leucocytes en raison de quoi les résultats obtenus seront faux. Je n'ai pu trouver d'indications sur ce sujet dans la littérature et j'ai étudié

l'action du séjour à l'étuve sur les leucocytes dans toute une série d'expériences.

Pour juger de la vitalité des leucocytes, je me suis servi comme Wolff de la méthode de Nakanishi [24].

Cette méthode est basée sur le fait que les noyaux des leucocytes morts fixent les colorants, tandis que les noyaux des leucocytes vivants restent incolores. La coloration se fait de la manière suivante : on mélange sur une lame des leucocytes humides avec une solution de bleu de méthylène; on couvre le tout avec une lamelle et on examine tout de suite sous le microscope ayant soin de procéder toujours rapidement car les leucocytes succombent très vite sous la lamelle dans la solution du bleu de méthylène.

Il faut tâcher d'éviter que les leucocytes ne se collent les uns aux autres pour former des amas, car dans ce dernier cas ils ne sont pas atteints par le colorant et les leucocytes morts produisent l'effet de leucocytes vivants. Enfin, il faut tenir compte du fait que les noyaux des leucocytes morts depuis longtemps peuvent également perdre la propriété de se colorer. Dans ce cas, on peut observer la sortie du protoplasme de sa membrane. Ainsi, avec une certaine habitude, on peut apprécier la quantité de cellules vivantes et de cellules mortes. Pour juger de l'influence du séjour à l'étuve sur les leucocytes, j'ai analysé la préparation toutes les deux heures.

TABLEAU VII.

SÉJOUR A L'ÉTUVE	QUANTITÉ DE LEUCOCYTES VIVANTS, p. 100.
—	—
Après 2 heures	90 p. 100
Après 4 heures	85 —
Après 6 heures	75 —
Après 8 heures	70 —
Après 12 heures	65 —
Après 24 heures	50 —
Après 48 heures	5 —

On voit d'après cette table que plus de la moitié des leucocytes gardent leur vitalité après un séjour de douze heures à l'étuve à 37°5.

Je vais citer mes expériences faites dans les mêmes condi-

tions que les précédentes, en modifiant seulement le temps du séjour à l'étuve aussi bien du mélange de leucocytes et de toxines que de la toxine seule qui servait pour les animaux témoins.

TABLEAU VIII. *Toxine diphtérique + leucocytes de cheval.* — Inoculation sous-cutanée aux cobayes après un séjour de douze heures à l'étuve. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : survivent	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,5	325 gr.	6 jours.	335 gr.	7 jours.
0,01	0,4	340 gr.	6 jours.	350 gr.	5 jours.
0,015	0,4	320 gr.	6 jours.	330 gr.	3 jours.
0,02	0,6	300 gr.	6 jours.	310 gr.	2 jours.

TABLEAU IX. *Toxine diphtérique + leucocytes de cheval.* — Inoculation sous-cutanée du liquide seul, séparé des leucocytes par centrifugation après un séjour de douze heures à l'étuve du mélange tout entier.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,6	345 gr.	Survit.	385 gr.	7 jours.
0,01	0,5	355 gr.	Survit.	350 gr.	5 jours.
0,015	0,6	320 gr.	Survit.	330 gr.	3 jours.
0,02	0,5	300 gr.	Survit.	310 gr.	2 jours.

Ces deux expériences ont été répétées et les résultats obtenus ont été toujours les mêmes. Nous voyons d'après ces expériences que les leucocytes de cheval ayant séjourné douze heures à l'étuve détruisent la toxine diphtérique, car ni le mélange de toxine + leucocytes, ni le liquide obtenu par centrifugation ne se montrent plus toxiques.

Pour être plus sûr que nous sommes ici en présence d'un

phénomène de neutralisation de la toxine et non de son absorption par les leucocytes, j'ai fait l'expérience suivante : le mélange de leucocytes et de toxine fut laissé à l'étuve douze heures à 37°. On le centrifuge ensuite pour séparer les leucocytes du liquide, et on inocule aux cobayes séparément le liquide et les leucocytes. Le liquide inoculé comme d'habitude provenait d'une dose de toxine + leucocytes, tandis que les leucocytes inoculés provenaient de deux doses pareilles. De sorte que, si les leucocytes ne faisaient qu'absorber la toxine sans la neutraliser, la dose double devait se montrer plus toxique que la dose simple.

TABLEAU X. *Toxine diphtérique + leucocytes de cheval.* — Après un séjour de douze heures du mélange à l'étuve, on inocule séparément le liquide et les leucocytes. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LIQUIDE		ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LEUCOCYTES		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,5	240 gr.	Survit.	205 gr.	Survit.	255 gr.	7 jours.
0,01	0,5	200 gr.	Survit.	205 gr.	Survit.	230 gr.	4 jours.
0,015	0,5	220 gr.	Survit.	200 gr.	Survit.	240 gr.	4 jours.
0,02	0,5	210 gr.	Survit.	200 gr.	Survit.	220 gr.	3 jours.

On peut dire, en se basant sur cette expérience, que les leucocytes neutralisent la toxine diphtérique.

On peut objecter à ces résultats que tous ces phénomènes étaient dus au sérum du sang, duquel les leucocytes n'auraient pas été suffisamment débarrassés par les lavages.

Pour contrôler ce point j'ai fait une autre expérience en utilisant le sérum du même cheval après y avoir ajouté la même quantité de citrate.

TABEAU XI. *Toxine diphtérique + sérum de cheval.* — Inoculation aux cobayes après le séjour du mélange de douze heures à l'étuve. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule. L'expérience a été répétée à plusieurs reprises.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de sérum	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	1 c. c.	250 gr.	7 jours.	255 gr.	7 jours.
0,01	1 c. c.	220 gr.	5 jours.	230 gr.	4 jours.
0,015	1 c. c.	230 gr.	4 jours.	240 gr.	4 jours.
0,02	1 c. c.	215 gr.	2 jours.	220 gr.	3 jours.

Il est évident que le sérum n'a aucune action sur la toxine diphtérique.

Il nous reste encore à étudier l'action des leucocytes morts sur la toxine et nous assurer aussi si leur capacité de fixer la toxine n'est pas une propriété physico-chimique.

Pour répondre à cette question, j'ai tués les leucocytes récemment obtenus par un chauffage d'une heure au bain-marie à 55 degrés, après quoi tous les leucocytes se colorent par le bleu de méthylène. J'ai procédé ensuite de la même façon que pour les leucocytes vivants. J'ai inoculé aux cobayes soit le mélange contenant les leucocytes + toxine après son séjour de douze heures à l'étuve, soit le liquide séparé des leucocytes par centrifugation, soit enfin les leucocytes et le liquide séparément.

TABEAU XII. *Toxine diphtérique + leucocytes morts.* — Inoculation du mélange aux cobayes après séjour à l'étuve. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,5	250 gr.	7 jours.	260 gr.	6 jours.
0,01	0,4	200 gr.	5 jours.	210 gr.	5 jours.
0,015	0,4	220 gr.	3 jours.	200 gr.	4 jours.
0,02	0,5	210 gr.	2 jours.	215 gr.	2 jours.

TABLEAU XIII. L'expérience est faite dans les mêmes conditions que la précédente, mais au lieu du mélange on inocule le liquide séparé de leucocytes par centrifugation.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,4	270 gr.	5 jours.	260 gr.	6 jours.
0,01	0,5	250 gr.	4 jours.	210 gr.	5 jours.
0,015	0,5	210 gr.	4 jours.	200 gr.	4 jours.
0,02	0,6	220 gr.	3 jours.	215 gr.	2 jours.

TABLEAU XIV. Même expérience que les précédentes, avec le seul changement que le liquide fut inoculé à part et les leucocytes à part, après un séjour du mélange à l'étuve pendant douze heures. Les quantités inoculées ont été les suivantes : le liquide provenant d'une seule dose de toxine + leucocytes, tandis que les leucocytes provenaient d'une dose double. La distribution était ici la même que celle du tableau X, avec la différence que les leucocytes employés avaient été tués.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LIQUIDE		ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LEUCOCYTES		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,008	0,5	200 gr.	3 jours.	190 gr.	Survivants.	205 gr.	4 jours.
0,01	0,4	185 gr.	3 jours.	190 gr.	—	180 gr.	3 jours.
0,015	0,5	180 gr.	2 jours.	210 gr.	—	190 gr.	2 jours.
0,02	0,5	190 gr.	2 jours.	210 gr.	—	185 gr.	12 heures.

Il résulte de ces trois expériences que les leucocytes morts n'ont aucune influence sur la toxine, car le liquide séparé par centrifugation, ainsi que le mélange du liquide avec les leucocytes, exercent la même action que la toxine seule. De plus, les leucocytes seuls après la séparation du liquide se montrent dépourvus d'action toxique, tandis que le liquide la conserve tout entière, comme on le voit d'après le tableau XIV. Ce résultat prouve nettement l'incapacité des leucocytes morts d'absorber la toxine.

On pouvait objecter à cette dernière expérience le fait que nous ne savons pas si les leucocytes vivants de ce cheval auraient eu une autre action que les leucocytes morts. Pour répondre à cette objection, j'ai fait des expériences avec des leucocytes morts et vivants provenant d'un seul cheval et provenant de la même portion de sang.

TABEAU XV. *Toxine diphtérique + leucocytes vivants. Toxine diphtérique + leucocytes morts.* — Inoculation du mélange aux cobayes après un séjour de douze heures à l'étuve. *Animaux témoins : toxine seule.*

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LEUCOCYTES VIVANTS		ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LEUCOCYTES MORTS		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,011	0,5	175 gr.	Survivants.	185 gr.	4 jours.	180 gr.	4 jours.
0,01	0,5	180 gr.	—	170 gr.	3 jours.	195 gr.	2 j. 1/2.
0,015	0,5	185 gr.	—	160 gr.	2 jours.	175 gr.	2 jours.
0,02	0,5	170 gr.	—	190 gr.	1 j. 1/2.	185 gr.	1 jour.

Cette expérience nous montre que les leucocytes vivants neutralisent la toxine diphtérique, tandis que les leucocytes morts restent indifférents vis-à-vis de cette dernière.

Il faut conclure de ce qui précède que les leucocytes provenant du sang de cheval sont capables de neutraliser des quantités considérables de toxine diphtérique et qu'il suffit de 0,5 de leucocytes pour que la neutralisation de deux doses mortelles de toxine pour le cobaye se produise. De plus, ce sont seulement les leucocytes vivants qui possèdent la propriété de neutraliser la toxine et cette propriété est le résultat de leur activité et non une propriété physico-chimique de leur protoplasme.

J'avais grand intérêt à voir si la neutralisation de la toxine ne se produirait pas avec un séjour à l'étuve de moins de douze heures.

J'ai fait dans ce but l'expérience suivante : une série de tubes contenant le mélange de toxine + leucocytes ont été placés à l'étuve pendant dans des temps variables et ensuite j'ai inoculé ces mélanges aux cobayes.

TABLEAU XVI. *Leucocytes vivants + toxine diphtérique*, ayant subi un séjour à l'étuve de deux, quatre, huit, seize heures. Ensuite, j'ai inoculé aux cobayes le mélange de toxine + leucocytes. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule après un séjour de six heures à l'étuve.

TEMPS de séjour, à l'étuve	QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
			Poids des animaux	Résultats : mort après	Poids des animaux	Résultats : mort après
2 heures.	0,008	0,5	185 gr.	2 jours.	170 gr.	4 jours.
2 heures.	0,01	0,4	175 gr.	4 jours.	180 gr.	2 jours.
4 heures.	0,01	0,5	200 gr.	Survit.	170 gr.	4 jours.
4 heures.	0,015	0,5	195 gr.	7 jours.	180 gr.	2 jours.
6 heures.	0,01	0,4	200 gr.	Survit.	170 gr.	4 jours.
6 heures.	0,015	0,4	195 gr.	—	170 gr.	2 jours.
6 heures.	0,015	0,4	185 gr.	Survit.	170 gr.	4 jours.
6 heures.	0,02	0,4	190 gr.	—	180 gr.	2 jours.

Ainsi nous voyons qu'il suffit d'un séjour de quatre heures à l'étuve pour que la neutralisation de la toxine par les globules blancs se produise. En ce moment, 85 p. 100 des leucocytes gardent encore leur vitalité.

Je passe à présent aux expériences faites avec la toxine tétanique.

Dans ce dernier cas, j'ai étudié l'influence des leucocytes extraits du sang de cheval. La méthode d'extraction des leucocytes nous est déjà connue et je cite seulement les résultats obtenus.

TABLEAU XVII. *Leucocytes de cheval + toxine tétanique*. — Inoculation sous-cutanée du mélange aux cobayes après un séjour d'une heure à l'étuve. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort après	Poids des animaux	Résultats : mort après
0,015	0,5	220 gr.	7 jours.	210 gr.	6 jours.
0,0025	0,4	200 gr.	5 jours.	215 gr.	5 jours.
0,0055	0,5	195 gr.	3 jours.	200 gr.	5 jours.

TABLEAU XVIII. *Leucocytes de cheval + toxine tétanique* — Inoculation aux cobayes du liquide séparé de leucocytes par centrifugation après un séjour du mélange à l'étuve pendant une heure. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,0015	0,5	210 gr.	8 jours.	210 gr.	6 jours.
0,0025	0,5	185 gr.	5 jours.	215 gr.	5 jours.
0,0035	0,4	195 gr.	3 jours.	200 gr.	5 jours.

Tout d'abord, j'ai étudié l'influence sur les cobayes de ces leucocytes après leur séjour durant une heure à l'étuve en présence de la toxine et ensuite après un séjour de douze heures. La dose mortelle de toxine tétanique était de 0,002 et tuait un cobaye du poids de 200 grammes dans l'espace de cinq jours.

De sorte que nous voyons que les leucocytes de cheval sont incapables d'absorber ou de neutraliser la toxine tétanique. Pour confirmer l'absence d'absorption, je cite une expérience faite avec la toxine tétanique.

TABLEAU XIX. *Leucocytes de cheval + toxine tétanique*. — Après un séjour d'une heure à l'étuve, j'ai inoculé aux cobayes séparément le liquide et les leucocytes. La portion des leucocytes provenait d'une dose double du mélange toxique. Le liquide a été inoculé comme d'habitude. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LIQUIDE		ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LEUCOCYTES		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,002	0,5	190 gr.	5 jours.	190 gr.	Survit.	200 gr.	6 jours.
0,0035	0,6	215 gr.	4 jours.	190 gr.	Survit.	218 gr.	3 jours.
0,004	0,6	185 gr.	2 jours.	185 gr.	Survit.	220 gr.	2 jours.
0,0045	0,6	170 gr.	2 j. 1/2	185 gr.	Survit.	200 gr.	1 j. 1/2

Cette expérience nous montre que les leucocytes n'absorbent dans aucun cas la toxine tétanique, car tandis que le liquide provenant du mélange des leucocytes avec la toxine est aussi toxique que la toxine elle-même, les leucocytes restent inoffensifs. De sorte que nos résultats diffèrent complètement de ceux obtenus par M. Wolff. D'après cet auteur, la toxine tétanique est absorbée non seulement par les leucocytes vivants, mais aussi par les leucocytes morts. Il me semble que les résultats obtenus par M. Wolff dépendaient de la méthode qu'il employait. Du mélange de toxine et de leucocytes après son séjour à l'étuve il inoculait non la partie liquide, mais les leucocytes soigneusement lavés en se servant d'une forte quantité de toxine. Les leucocytes se trouvant dans un milieu très toxique gardaient, même après des lavages répétés, une dose de toxine suffisante pour tuer les souris.

Si M. Wolff réussissait à obtenir des eaux de lavage non toxiques, nous pouvons expliquer ce phénomène par la supposition que la membrane des leucocytes était imbibée par cette solution si riche en toxine, ce qui empêchait le passage de cette dernière dans les eaux de lavage.

Pour rendre ces expériences probantes, il aurait fallu montrer qu'une poudre inerte quelconque mélangée dans les mêmes conditions à de la toxine tétanique pourrait en être complètement débarrassée par une triple centrifugation.

TABLEAU XX. — *Leucocytes de cheval + toxine tétanique.* — Inoculation du mélange après un séjour de douze heures à l'étuve. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,002	0,5	215 gr.	6 jours.	220 gr.	5 jours.
0,0025	0,5	225 gr.	4 jours.	210 gr.	4 jours.
0,003	0,5	260 gr.	5 jours.	230 gr.	3 jours.
0,004	0,6	230 gr.	3 jours.	225 gr.	2 jours.

TABIEAU XXI. — *Leucocytes de cheval + toxine tétanique.* — Inoculation aux cobayes du liquide séparé par centrifugation après un séjour de douze heures à l'étuve. Les leucocytes sont inoculés séparément comme dans le tableau XIX. Les animaux témoins reçoivent la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LIQUIDE		ANIMAUX D'EXPÉRIENCE LEUCOCYTES		ANIMAUX D'EXPÉRIENCE	
		Poids des animaux	Résultats : mort au bout de	Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,002	0,6	210 gr.	8 jours.	220 gr.	Survit.	220 gr.	6 jours.
0,0025	0,5	235 gr.	6 jours.	220 gr.	Survit.	210 gr.	4 jours.
0,003	0,5	220 gr.	4 jours.	235 gr.	Survit.	230 gr.	3 jours.
0,004	0,6	215 gr.	4 jours.	235 gr.	Survit.	225 gr.	2 jours.

On voit d'après ces expériences que les leucocytes de cheval sont incapables, même après un séjour de douze heures à l'étuve, de neutraliser ou d'absorber la toxine tétanique, car, tandis que le liquide reste aussi toxique que la toxine elle-même, les leucocytes séparés de ce liquide restent tout à fait inoffensifs.

Il est évident que la toxine tétanique est un poison sur lequel les globules blancs du cheval sont sans action, au moins en dehors de l'organisme. Il est possible qu'une durée plus longue et des conditions plus favorables soient nécessaires pour que la réaction se produise. J'avais l'intention de continuer mes recherches en expérimentant avec le sang de lapins, qui sont des animaux moins sensibles, mais malheureusement je n'ai pas réussi à en extraire les leucocytes, car leur sang se dépose si lentement que les globules blancs tombent au fond du vase en même temps que les globules rouges, et la quantité de leucocytes obtenus dans cette opération n'était pas suffisante. Voilà pourquoi j'ai décidé de continuer mes recherches sur les globules blancs provenant de l'exsudat péritonéal de lapins.

Pour extraire les globules blancs, j'ai inoculé dans le péritoine de lapins du bouillon mélangé avec de l'aleurone et contenant du blanc d'œuf à 1/10. J'ai injecté ce mélange à deux reprises dans l'intervalle de quatre jours. Ensuite, j'ai lavé le péritoine par la méthode ordinaire en me servant de solution

physiologique contenant 0,4 p. 100 de citrate de soude et j'ai obtenu 1.2 gr. de globules blancs de chaque lapin. Les globules blancs obtenus renfermaient 15 à 20 p. 100 de macrophages.

TABLEAU XXII.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes.	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,002	0,4	180 gr.	Survit.	170 gr.	3 jours.
0,0003	0,4	175 gr.	m. ap 7 j.	200 gr.	3 jours.
0,0035	0,5	190 gr.	m. ap. 6 j.	185 gr.	2 jours.
0,004	0,5	185 gr.	m. ap. 5 j.	175 gr.	2 jours.

Dans cette expérience j'ai inoculé aux cobayes le liquide séparé par centrifugation du mélange de globules et de toxine qui a séjourné à l'étuve pendant douze heures.

TABLEAU XXIII. *Toxine tétanique + globules blancs*, contenant la même quantité de macrophages. Après un séjour à l'étuve de douze heures on inocule le mélange. Les animaux témoins ont été inoculés avec la toxine seule.

QUANTITÉ de toxine	QUANTITÉ de leucocytes	ANIMAUX D'EXPÉRIENCE		ANIMAUX TÉMOINS	
		Poids des animaux	Résultats	Poids des animaux	Résultats : mort au bout de
0,002	0,4	170 gr.	Survit.	130 gr.	4 jours.
0,003	0,4	165 gr.	m. ap. 7 j.	200 gr.	3 jours.
0,0035	0,4	180 gr.	m. ap. 5 j.	185 gr.	3 jours.
0,004	0,4	175 gr.	m. ap. 4 j.	175 gr.	1 j. 1/2

Ces expériences nous montrent que les globules blancs provenant de l'exsudat qui contenait 20 p. 100 de macrophages sont capables, quoique très faiblement, de neutraliser la toxine tétanique. Faute de temps, je n'ai pu continuer mes recherches, et la question de savoir si ce sont les leucocytes polynucléaires

ou les macrophages qui ont agi dans ce dernier cas reste pour le moment ouverte.

M. Petterson considère que les macrophages sont les seuls éléments capables d'agir sur la toxine diphtérique. En tout cas, on peut supposer que les globules blancs de lapin, qui contiennent également dans leur composition des macrophages, sont capables de neutraliser la toxine tétanique. Les résultats peu nets que j'ai obtenus dépendent probablement de ma technique que, faute de temps, je n'ai pu perfectionner. Il est fort probable que les leucocytes des autres animaux neutralisent également cette toxine, mais il peut aussi arriver que les leucocytes de différentes origines se comportent différemment envers diverses toxines.

Si les recherches faites avec la toxine tétanique sont incomplètes et ont besoin d'être confirmées, on ne peut pas en dire autant de l'action des leucocytes de cheval sur la toxine diphtérique. Ce fait de la neutralisation de la toxine nous montre nettement que les globules blancs sont les défenseurs de l'organisme non seulement contre les bactéries, mais aussi bien contre leurs toxines et constituent un facteur important d'immunité naturelle contre ces dernières.

En résumé, nous pouvons formuler les conclusions suivantes :

1. Les leucocytes de cheval possèdent la propriété de neutraliser le poison diphtérique et cette capacité ne dépend pas de la propriété physico-chimique de leur protoplasme, mais bien de leur activité vitale.

2. Les leucocytes de cheval ne sont capables ni d'absorber, ni de neutraliser le poison tétanique. Seuls les leucocytes de lapin renfermant 15 à 20 p. 100 de macrophages possèdent cette propriété, mais l'effet de ce mélange n'est pas très prononcé.

3. Les leucocytes sont les défenseurs de l'organisme dans sa lutte contre les agents pathogènes et leurs toxines et déterminent l'immunité naturelle contre ces dernières.

Avant de finir, je prends la liberté d'exprimer ma plus profonde reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff aussi bien

pour le sujet du présent travail que pour ses précieuses indications.

J'exprime également ma gratitude à MM. les D^{rs} Besredka et Wollman, qui se sont toujours montrés disposés à me servir de leurs conseils amicaux.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] METCHNIKOFF. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, 1889.
- [2] METCHNIKOFF. — *Ergebn. d. allgem. Pathol., Lubarsch und Osterlag*, Bd II.
- [3] SCHATTENFROH. — *Arch. f. Hyg.*, Bd XXXI-XXXV.
- [4] SCHNEIDER. — *Münch. med. Woch.*, 1908, n° 10; — *Arch. f. Hyg.*, Bd LXX.
- [5] MUCH. — *Mitteil. a. d. Hamburger Staatskrankenanstalt*, Bd III.
- [6] PETTERSON. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd I, Orig.; — *Zentralbl. f. Bakter.*, 1 Abt., Orig., Bd L.
- [7] GRÜBER und FUTAKI. — *Münch. med. Woch.*, 1907, p. 249.
- [8] BAIL. — *Arch. f. Hyg.*, Bd XXX-XXXII; — *Zentralbl. f. Bakter.*, Bd XXXIII.
- [9] WEIL. — *Arch. f. Hyg.*, Bd LXX-LXXI.
- [10] WASSERMANN et TAKAKI. — *Berlin. med. Wochenschr.*, 1898, p. 5.
- [11] PETTERSON. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd VIII, Orig.
- [12] METCHNIKOFF. — *Annales de l'Institut Pasteur*. Vol. VI, 1897.
- [13] VAILLARD et ROUX. — *Annales de l'Institut Pasteur*. Vol. VI, 1892.
- [14] BRIEGER, KITASATO et WASSERMANN. — *Zeitschr. f. Hyg.*, etc., Bd XII, 1892.
- [15] MANCINI. — *Biochemische Zeitschr.*, Bd XXIX, p. 140, 1910.
- [16] STENSTRÖM. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd VIII, Orig.
- [17] WOLF. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd XVIII.
- [18] FRIEDBERGER und SZYMANOWSKI. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd XI, Orig.
- [19] MASSONE. — *Berlin. klin. Wochenschr.*, n° 52, 1911.
- [20] MIYAJI. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd XII.
- [21] KLING. — *Zeitschr. f. Immunit.*, Bd VII.
- [22] HEKTA. — *Bioch. Zeitschr.*, Bd XI, 1908.
- [23] HAMBURGER. — *Untersuchung. von Leucocyten*, 1913.
- [24] NAKANISHI. — *Deutsch. med. Wochenschr.*, n° 6. 1900.
- [25] VAILLARD et ROGET. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VI, 1892.
- [26] SALOMONSEN et MADSEN. — *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XI, 1897.

ERRATUM

Mémoire de ÉT. BURNET : *La prétendue destruction des bacilles de Koch dans le péritoine des cobayes tuberculeux* (mars 1915).

Page 135, ligne 8, en partant du bas, *lire* : d'anticorps circulants, dont le rôle n'est pas démontré.

Le Gérant : G. MASSON.